

⑬ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 573 627

⑫ N° d'enregistrement national :

84 18415

⑬ Int Cl⁴ : A 23 C 19/072, 19/10; C 12 N 1/08 / C 12 N
9/36; (C 12 N 1/08, C 12 R 1:145).

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑭ Date de dépôt : 29 novembre 1984.

⑮ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : Société dite : ENTREMONT SA, Société
anonyme, Société dite : BIOSYS SA, Société anonyme,
INSTITUT TECHNIQUE DU GRUYERE et LEGAULT-DE-
MARE Jean. — FR.

⑱ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 22 du 30 mai 1988.

⑲ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑳ Inventeur(s) : Jean Legault-Dénare, Laurent Caignault,
Jacques Frankinet, Bertrand Favreau et Paul Crétin-Malte-
naz.

㉑ Titulaire(s) :

㉒ Mandataire(s) : Cabinet Michel Laurent.

㉓ Procédé pour la fabrication de produits laitiers au moyen d'anticorps.

㉔ Procédé pour la fabrication de produits laitiers au moyen
d'anticorps, caractérisé en ce que l'on incorpore au lait un
anticorps antispores de *Clostridium tyrobutyricum*, sur lequel a
été fixée une substance apte à détruire les bactéries issues
desdites spores.

Application : fabrication de fromage à pâte pressée cuite.

FR 2 573 627 - A1

BEST AVAILABLE COPY

2573627

- 1 -

PROCEDE POUR LA FABRICATION DE PRODUITS LAITIERS, AU
MOYEN D'ANTICORPS.

5 L'invention concerne un procédé pour la fabrication de produits laitiers, notamment un procédé pour la fabrication de fromages, et plus précisément de fromages à pâte pressée cuite.

10 Comme on le sait, le lait contient de nombreuses bactéries. Certaines de ces bactéries, en se développant, se transforment en spores qui, lorsque les conditions deviennent favorables notamment sous l'effet de l'élévation du pH et de la température, germent pour donner naissance à de nouvelles bactéries qui alors se multiplient. Certaines bactéries sont nécessaires. En revanche, d'autres sont indésirables. Parmi ces bactéries nuisibles, on
15 connaît celles dénommées *Clostridium tyrobutyricum* dont la présence, lors de l'affinage, est susceptible de provoquer des accidents techniques, tels que notamment des gonflements tardifs du fromage et des mauvais goûts.

20 La spore de cette bactérie, dénommée par les techniciens du lait "butyrique" est malheureusement thermorésistante à la température de pasteurisation, de sorte qu'elle n'est pas détruite lors de l'opération classique de pasteurisation.

25 Pour éliminer cette spore nuisible, on a tout d'abord proposé de faire appel à des moyens physiques, tels que la centrifugation (dénommée également "bactofugation") ou à la décantation (dénommée aussi "crémage"). Ces techniques physiques ont malheureusement une efficacité pratique assez limitée et surtout nécessitent des investissements importants.
30

Récemment, on a proposé d'éliminer l'influence des spores butyriques par voie chimique. On a suggéré par exemple d'incorporer au lait des sels oxydants, tels que des nitrates. Bien que cette technique donne parfois de
35 bons résultats, notamment avec les fromages de Gouda,

BEST AVAILABLE COPY

2573627

- 2 -

elle est de plus en plus interdite dans de nombreux pays, par suite de ses possibles effets cancérogènes secondaires.

Dans le brevet britannique GB-A-2 014 032, on a proposé d'ajouter au lait du lysozyme ou un sel organique non toxique de lysozyme. Ce traitement prévient efficacement l'hyperfermentation de la spore *Clostridium tyrobutyricum* et même le *Clostridium Sporogènes*. Malheureusement, le lysozyme s'adsorbe au hasard sur le réseau de caséine ce qui, d'une part, nécessite d'en ajouter des quantités appréciables (de l'ordre d'au moins 200 mg/kg de fromage) et d'autre part et surtout, a des effets secondaires négatifs sur certains ferments qui sont indispensables à la fabrication du fromage.

Bref, bien que l'incorporation du lysozyme au lait soit autorisée, ce procédé ne peut être généralisé à la fabrication de fromages, notamment de fromage à pâte pressée cuite, car il nécessite des quantités importantes de réactifs et surtout n'est pas sélectif.

L'invention pallie ces inconvénients. Elle concerne un procédé pour le traitement du lait qui vise à éliminer l'influence des spores de *Clostridium tyrobutyricum* pour empêcher, lors de la fabrication du fromage, les effets pervers de cette bactérie indésirable, sans toutefois attaquer les autres bactéries, notamment à Gram positif, qui sont nécessaires pour l'élaboration de ce fromage.

Ce procédé selon l'invention, pour la fabrication de produits laitiers au moyen d'anticorps, se caractérise en ce que l'on incorpore au lait un anticorps anti-spoires de *Clostridium tyrobutyricum* sur lequel a été fixée une substance apte à détruire les bactéries issues desdites spores.

Comme on le sait, un anticorps est une substance spécifique de défense formée dans un organisme à la suite de l'introduction d'un antigène dans cet organisme physique. Il s'agit de ce que l'on appelle une réaction immunitaire.

BEST AVAILABLE COPY

2573627

- 3 -

Les molécules d'anticorps présentent plusieurs sites actifs. Ces composés sont bien connus et largement décrits dans la littérature.

Avantageusement, la substance fixée sur l'anticorps est choisie dans le groupe constitué par le lysozyme, la nisine, les produits bactériolytiques.

En d'autres termes, l'invention consiste, dans le lait, à fixer sur les spores indésirables *Clostridium tyrobutyricum*, des anticorps spécifiques ayant comme principe actif une substance bactériolytique, telle que le lysozyme, la nisine, etc.. Lors de la fabrication du fromage avec le lait ainsi traité, les spores indésirables qui portent les anticorps vont tout d'abord s'emprisonner dans le réseau de caséine, puis sous l'effet de l'augmentation de pH, voire de température, vont germer pour, lors de l'affinage du fromage, pour se transformer en se multipliant en bactéries indésirables. Mais en éclatant, les spores se trouvent environnées par les anticorps qui portent le principe actif. Ainsi, ces principes actifs entrent en contact avec les parois des bactéries naissantes au fur et à mesure de leur développement, détruisent ces bactéries en les lysant.

De même, comme on le sait, le lysozyme est une enzyme lytique qui catalyse l'hydrolyse de certaines liaisons glucidiques des polysaccharides de la paroi des bactéries. Cette enzyme que l'on trouve notamment dans le blanc d'oeuf (et que l'on dénomme aussi *muramidase*), agit sur les cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum*, mais est inactive sur la spore de ce micro-organisme.

Selon une autre image, à l'instar d'une fusée à tête chercheuse mais à bombe de retardement, l'anticorps spécifique avec son principe actif (lysozyme) est apte à reconnaître les spores indésirables, puis à venir se fixer sur ces spores. Lorsque sous l'effet de la germination, la spore indésirable se développe, puis se gonfle,

2573627

- 4 -

et enfin éclate pour donner naissance aux bactéries, les parois de ces bactéries formées se lysent au contact des principes actifs (lysozyme) portés par les anticorps qui se trouvent dans l'environnement immédiat et la bactérie
5 sitôt formée est lysée. Ces bactéries indésirables sont donc détruites au fur et à mesure de leur formation.

La préparation des anticorps spécifiques selon l'invention, s'effectue de manière connue. On injecte par exemple des spores entières chez un animal pour provoquer
10 la formation d'anticorps spécifiques de la spore de *Clostridium tyrobutyricum* ou de ses constituants. Par des méthodes physico-chimiques ou immunologiques connues, ces anticorps spécifiques sont purifiés.

Parallèlement, de façon connue, on prépare le produit
15 bactériolytique. Avantageusement pour des raisons économiques, on utilise le lysozyme du blanc d'oeuf (dénommé aussi "myramidase").

Egalement, de manière connue, on greffe ce principe
20 actif sur un ou plusieurs anticorps spécifiques de l'invention.

Dans une première forme de réalisation, le principe actif bactériolytique est greffé directement par une liaison covalente sur une molécule d'anticorps. L'anticorps greffé est ensuite dosé, puis est conditionné soit dans
25 du glycérol ou dans un mélange tampon glycérol, soit est lyophilisé. Ce produit greffé, dosé, conditionné est ensuite incorporé dans le lait, notamment lors de la phase dite de "maturation", c'est-à-dire l'étape de préparation du lait pour la transformation en fromage. On incorpore
30 au lait ce produit, à raison de 0,025 à 2,5 mg de principe actif par kilo de fromage. Puis de manière connue, on transforme le lait auquel on a incorporé ce produit greffé actif en fromage, par exemple en fromage à pâte pressée cuite. Lorsque, lors de l'affinage et plus précisément
35 ment de la germination, les bactéries se forment, elles

2573627

- 5 -

rencontrent les principes actifs, c'est-à-dire les lysozymes portés par les anticorps, qui les détruisent au fur et à mesure de leur formation.

Dans une deuxième forme de réalisation, les principes actifs sont incorporés dans un liposome couplé aux-dits anticorps anti-spoires spécifiques selon l'invention. Comme on le sait, un "liposome" est une enveloppe contenant des substances solubles. De manière connue, on fabrique donc un liposome contenant du produit bactériolytique. De même, de manière connue, lors de la préparation de ces liposomes, on introduit dans leur membrane des molécules amphiphiles (lipopolysaccharides ou lipoprotéines) sur lesquelles on fixe des protéines telles que des anticorps anti-spoires sans principe actif. Lors de la maturation du lait, on incorpore la même quantité de liposomes que ci-dessus, c'est-à-dire de 0,025 à 2,5 mg de principe actif par kilo de fromage.

Lors de la transformation du lait en fromage, par exemple lors de l'étape de chauffage à 53°C, la membrane du liposome se détruit en libérant les principes actifs dans l'environnement immédiat des spores.

La manière dont l'invention peut être réalisée et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples qui suivent donnés à titre indicatif mais non limitatif.

Exemple 1 :

De manière connue, le lait est pasteurisé et standardisé au taux de matières grasses voulu. Ce lait subit ensuite une étape de maturation par un stockage à température contrôlée (en pratique à une température comprise entre 4 et 18°C) avec adjonction de ferments lactiques et ce, pendant une durée comprise entre huit et vingt heures.

Parallèlement, de manière connue, on greffe par covalence une ou plusieurs molécules de *muramidase* sur une

2573627

- 6 -

molécule d'anticorps anti-spores dosée à un milligramme de protéines par millilitre et conditionné dans un mélange tampon-glycérol 1/1. Ce complexe biologique est additionné au lait au début de la phase de maturation et
5 est dispersé dans le lait sous l'effet d'une légère agitation ou d'une agitation intermittente. L'anticorps spécifique se fixe donc sélectivement sur les spores de *Clostridium tyrobutyricum*.

On procède ensuite à la fabrication classique d'un
10 fromage d'Emmental, notamment avec les étapes traditionnelles de réchauffage à 30-33°C, coagulation, découpage du grain, brassage, chauffage à 50-53°C, lavage éventuel, mise du grain en moule, pressage, mise en saumure. Pendant toutes ces opérations, les complexes anticorps-principes actifs se
15 fixent ou restent proches des spores.

Lorsque durant l'opération d'affinage les conditions deviennent favorables (notamment de pH ou de température), les spores germent et les cellules végétatives formées sont immédiatement détruites par lyse grâce au lysozyme
20 agissant comme principe actif.

Ainsi, dans l'Emmental formé, on ne détecte plus la présence des bactéries nuisibles *Clostridium tyrobutyricum*. On évite ainsi les effets néfastes de gonflement et de mauvais goût.

25 Exemple 2 :

On répète l'exemple 1, mais en remplaçant l'anticorps spécifique couplé directement par liaison covalente par un anticorps couplé à des liposomes contenant à l'intérieur de leur membrane du lysozyme. La membrane thermo-
30 sensible de ces liposomes se détruit à une température de lyse correspondant à la température de brassage (entre 48 et 70°C). De la même façon qu'à l'exemple 1, lors de l'élévation de la température, la membrane du liposome va éclater en libérant les principes actifs (lysozyme)
35 qui vont immédiatement s'adsorber sur le réseau de caséine.

2573627

- 7 -

à proximité de la spore, lorsque cette spore nuisible va germer pour donner naissance à de nouvelles bactéries.

Au fur et à mesure de leur développement, le lysozyme lyse les cellules végétatives formées, détruisant ainsi

5 ces bactéries au fur et à mesure de leur formation.

Dans le fromage formé, comme précédemment, on obtient pas la présence de bactéries nuisibles.

Exemple 3 :

10 On répète l'exemple 1 en remplaçant le lysozyme par de la nisine.

On obtient des résultats analogues.

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés connus à ce jour, notamment ceux du type dans lequel on faisait déjà appel
15 à du lysozyme (voir notamment GB-A-2 014 032 cité dans le préambule). On peut essentiellement citer :

- le fait d'être sélectif puisque l'on fait appel à un anticorps anti-sporés spécifique qui permet ainsi l'utilisation optimale du principe actif ; en effet, si
20 ce principe actif était libre dans le lait, il détruirait indistinctement un grand nombre de bactéries à Gram positif, y compris les ferments qui sont nécessaires à la fabrication du fromage ; cela permet de réduire considérablement la quantité de principes actifs à incorporer,
25 puisque, en pratique, il suffira de quantité mille à cent mille fois moindres, ce qui réduit considérablement les coûts d'exploitation ;

- enfin, l'absence d'effets pervers, puisque on n'élimine que le *Clostridium tyrobutyricum* et rien d'autre.
30

2573627

- 8 -

REVENDEICATIONS

1/ Procédé pour la fabrication de produits laitiers au moyen d'anticorps, caractérisé en ce que l'on incorpore au lait un anticorps anti-spoires de *Clostridium tyro-*
5 *butyricum*, sur lequel a été fixée une substance apte à détruire les bactéries issues desdits spores.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la substance fixée sur l'anticorps est choisie dans le groupe constitué par le lysozyme, la nisine, les
10 produits bactériolytiques.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le principe actif du lysozyme est fixé sur l'anticorps anti-spoires.

4/ Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le lysozyme est greffé directement sur l'anti-
15 spores par liaison covalente.

5/ Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'anticorps greffé est soit conditionné dans du glycérol, soit est lyophilisé.

6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le principe actif est incorporé dans un liposome couplé auxdits anticorps-anti-spoires.

7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que lesdits anticorps anti-spoires sont greffés sur
25 la membrane du liposome contenant les principes actifs.

8/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'incorporation de l'anticorps anti-spoires spécifique s'effectue lors de la maturation du lait en vue de sa transformation en fromage.

9/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on incorpore de 0,025 à 2,5 mg de principe actif par kilo de fromage.

10/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en

2573627

- 9 -

ce que le principe actif fixé sur l'anticorps est libéré
lors de la germination du spore dans le lait transformé
en fromage.

5